第39卷 第2期 昆 虫 学 报 Vol.39, No.2
1996年 5月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA May, 1996

蜂王浆中一种有抗菌活性的小肽*

肖静伟** 王戎疆 李绍文
(北京大学生命科学学院 北京 100871)

李举怀
(北京市农林科学院 北京 100081)

摘要 用分子筛柱层析的方法，从蜂王浆的水溶性物质中分离出一种新的活性肽，对革兰氏阳性菌有明显的抑制作用，其分子量约为2.3kD，含8种氨基酸，其中甘氨酸占33%，表明它是一种富含甘氨酸的小肽。

关键词 蜂王浆，活性肽，抑菌作用

蜂王浆(royal jelly)又称蜂乳，系蜜蜂5～15日龄工蜂的咽下腺分泌的乳白色或淡黄色粘稠浆状物，pH 3.5～4.5，它是蜜蜂饲喂蜂王和幼龄幼虫的主要食物。所有幼虫在孵化后的3 d 内都由青年工蜂喂饲蜂王浆，3 d 后，工蜂房里的幼虫改喂花粉和蜂蜜的混合物，而王台里的幼虫继续饲喂蜂王浆，同样是受精卵前者发育为工蜂，后者发育为蜂王。

蜂王浆，作为一种良好的保健滋补品一直受到人们的关注，近年来，它的医疗作用也引起人们的广泛注意。临床证明蜂王浆可增强体质，提高机体的适应力和免疫力，对内分泌也有一定的影响，同时，还有抗衰老、延长寿命的作用[1]。蜂王浆的成分比较复杂，含多种蛋白质、氨基酸、糖和脂类物质，还有多种微量成分，一般认为蜂王浆的活性成分之一是10－羟基－2－癸烯酸(因只存在于蜂王浆中，又称王浆酸)，它的抗菌作用已得到较为明确的证实[2]。对蜂王浆中含氮物质的研究也有一些报道，如1970年Vittek[3]从蜂王浆中初步分离出一种糖蛋白。1977年Tomoda等[4]初步分析了蜂王浆的蛋白含量。1982年Kromer等[5]从蜂王浆中纯化出有降血糖作用的类胰岛素物质。1983年Takenaka和Echigo[6]对蜂王浆中的氮组分做了较多的研究。他们发现新鲜蜂王浆氮含量在2%左右，其中水溶性的占总氮量的89%。他们通过电泳和层析方法，初步分离出5种水溶性蛋白，2种不溶于水的蛋白和5种肽组分，但没有进一步纯化和鉴定。1990年Fujiwara等[7]报道，他们从蜂王浆水溶性成分中分离并纯化了一个活性肽，名为Royalisin，分子量为5 523Da，含18种共51个氨基酸，对革兰氏阳性菌有明显的抑制生长作用。

* 国家自然科学基金资助项目

** 现在美国夏威夷大学昆虫学系

1994－01－28收稿，1994－12－06收修改稿

本实验用柱层析方法，从蜂王浆水溶液中分离并纯化了一种新的活性肽组分，含8种氨基酸，分子量约为2.3 kD，具有明显的抑菌作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

(1) 蜂王浆取自北京市农林科学院，系意蜂 *Apis mellifera ligustioa* 在当年荆条流蜜期生产的，盛于白色塑料瓶中，－20℃低温保存备用。(2) 指示菌种皆由我学院微生物教研室提供，有大肠杆菌*Escherrichia coli*，金黄色葡萄球菌*Staphyloccus aureus*，枯草杆菌 *Bacillus subtilis*。

1.2 主要仪器和试剂

冷冻离心机 HITACHI SCR2DBC，核酸蛋白检测记录仪 SD－81－5B，紫外分光光度计 Shimadzu UV－Visible Recording Spectorophotometer UV－240 Graphicord，冰冻干燥机 VirTis，高压液相色谱 VARIAN 5 000 Liquid Chromatograph，氨基酸成分分析仪 BECKMAN 121 MB Amino Acid Analyzer。

Sephadex G－15 和 Sephadex G－10 为 Pharmacia 公司进口分装，DEAE 纤维素(DE52)为 Whatman 进口分装，琼脂粉 K 型为日本进口分装，其它试剂皆为国产分析纯。

1.3 方法

(1) 蜂王浆上清液的制备：称取蜂王浆 20g，加 100 mL 乙酸－氢氧化铵缓冲液，用乙酸或氢氧化铵将 pH 调至 7.0，置 100℃水浴加热 30 min 后，放入冰水中骤冷，低温高速离心 30 min(2℃，10 000g)，取上清液备用。(2) 分子筛柱层析：Sephadex G－15，用 0.033 mol/L pH3.2 的乙酸溶液洗脱，流速 0.35 mL/min，每 10 min 收集 1 管，上样量 20 mL，洗脱体积 600 mL，逐管收集，以洗脱液为对照测奇数管的 OD_{254} 值。(3) 冰冻干燥：由柱层析收集的溶液于干燥瓶中，在－40℃乙醇中转动使溶液均匀地在瓶壁上结冰，再将干燥瓶置冰冻干燥机上冰冻真空干燥。(4) 离子交换柱层析：DEAE 纤维素 DE52，平衡液为 0.005 mol/L pH8.5 Tris－HCl，平衡后梯度洗脱，起始缓冲液为 0.005 mol/L pH8.5 Tris－HCl，终止缓冲液为 0.005 mol/L pH8.5 Tris－HCl 含 2 mol/L NaCl，流速 0.4 mL/min，每 10 min 收集 1 管。(5) 脱盐：Sephadex G－10；洗脱液 0.033 mol/L pH3.2 乙酸，流速 0.3 mL/min，每 10 min 收集 1 管，以 0.1 mol/L 硝酸银检测氯离子的存在与否。(6) 高压液相色谱(HPLC)：C18 反相制备柱，洗脱液 B 液为 95% 乙醇，C 液为重蒸水，梯度洗脱由 50% 的 B 液经 30 min 到 100% 的 B 液，流速 0.5 mL/min。(7) 紫外扫描：190～300 nm，OD 值范围 0～2。(8) 氨基酸成分分析：取 0.7 mg 样品于水解管中，加 5 mL 5.7 mol/L 恒沸盐酸，真空封口，110℃水解 24 h，冷却定容至 10 mL。取 1 mL 抽干以除去盐酸，加样品缓冲液 2 mL，上机分析。(9) 抑菌实验：菌种活化后于 1 mL 无菌水中制成菌悬液。取 0.3 mL 菌悬液放入 9 cm 培

养皿中，加14 mL融化的肉膏蛋白胨培养基摇匀。待完全凝固后，用灭过菌的滤纸片(直径6 mm)蘸样品液置于培养基上，以甘氨酸水溶液和无菌水做对照实验，37 ℃恒温培养12 h，有抑菌活性的出现透明的抑菌圈。

2 结果

2.1 分子筛柱层析

经方法步骤(1)，20 g蜂王浆可得92 mL淡黄色透明溶液(pH5.5)。取此溶液20 mL上Sephadex G-15柱，用奇数管测254 nm和280 nm的紫外吸收，绘得图1，共6个峰，其中峰5为活性成分，有抑制革兰氏阳性菌的作用。

2.2 离子交换柱层析

蜂5经冰冻干燥得23 mg白色粉末。取15 mg溶解后上DEAE柱，经梯度洗脱，紫外检测有两个峰，峰5-1和峰5-2(图2)，后者是活性成分。

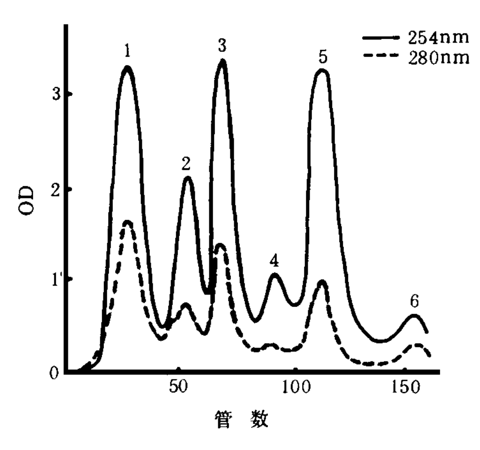


图1 蜂王浆水溶液成分Sephadex G-15柱层析图谱

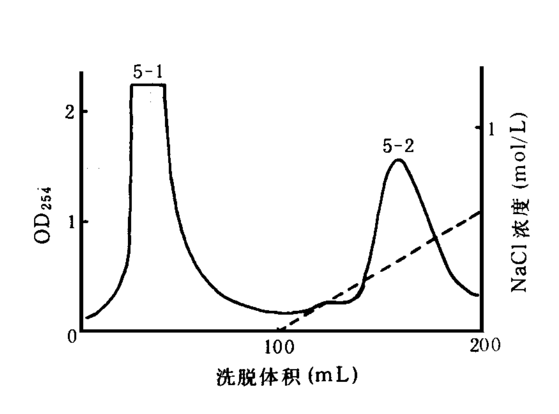


图2 蜂5离子交换柱层析图谱

2.3 脱盐

峰5-2经冰冻干燥后得到的白色粉末溶解后用银离子检测发现含大量盐分。用Sephadex G-10脱盐，紫外检测记录如图3。经冰冻干燥得0.7 mg淡黄色粉末。

2.4 HPLC检测

峰5在HPLC上有三个峰，峰5-I、峰5-II和峰5-III(图4)。峰5-2在HPLC上有两个峰，峰5-2-I和峰5-2-II(图5)。在检测峰5-2时，以同样条件用0.01 mol/L Tris 0.1mL做对照实验，仅出现一个峰，保留时间17.840 min，和峰5-2-II的保留时间17.343 min极相近，可认为峰5-2-II的成分是Tris，由此可认为峰5-2已纯化。

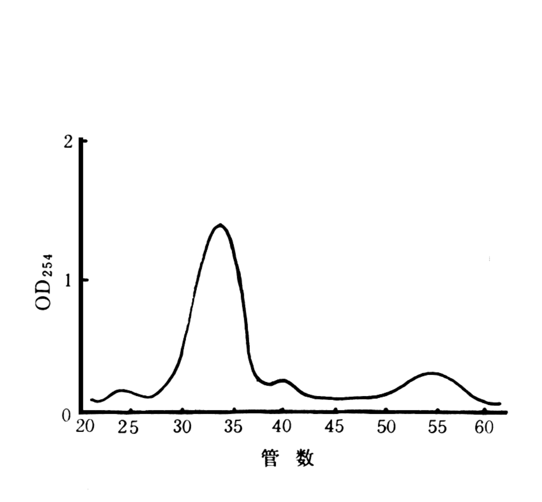


图3 峰5－2经Sephadex G－10柱脱盐紫外记录图谱

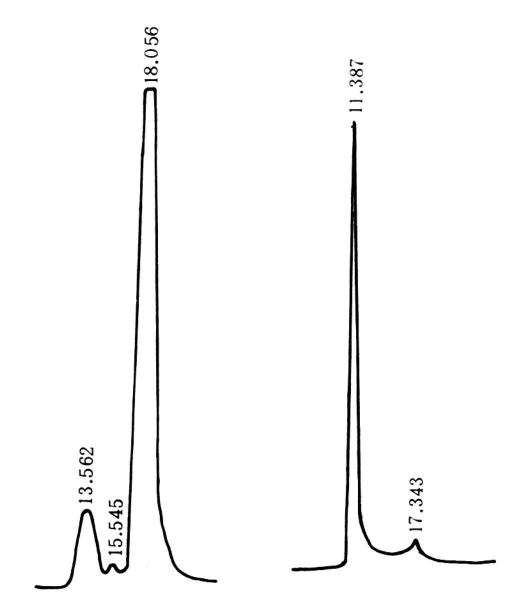


图4 峰5 HPLC图谱 图5 峰5－2 HPLC图谱

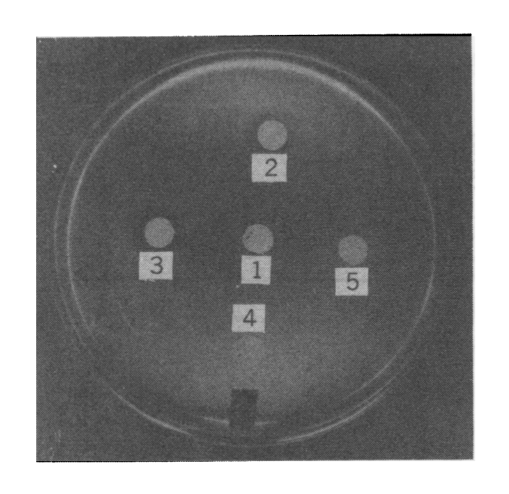


图6 几种成分对枯草杆菌的抑制图谱

1. 蜂王浆水溶液 10mg/mL 2. 峰5水溶液 10mg/mL 3. 峰5－2水溶液 10mg/mL 4. 甘氨酸水溶液 10mg/mL 5. 蒸馏水

2.5 抑菌实验

蜂王浆干粉、峰5和峰5－2对革兰氏阳性菌(枯草杆菌和金黄色葡萄球菌)有明显的抑制作用，对革兰氏阴性菌(大肠杆菌)则无效果。两个对照实验皆为阴性结果。蜂王浆水溶液抑菌效果不明显，是浓度较低的缘故。实验结果见图6，三种成分的比较列表1。

2.6 紫外吸收曲线

峰5在波长190～300nm间有两个吸收峰211nm和257nm(图7)。而峰5－2在该波长范围内只有一个吸收峰211nm(图8)，这说明峰5－2不含苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸等氨基酸。

2.7 氨基酸成分测定

取峰5－2样品23.3μg分析其氨基酸组成，具体结果见表2。由此表可见，回收氨基酸18.19μg，约占样品的78.07%。所含的8种氨基酸皆为脂肪族氨基酸，不含芳香族氨基酸和杂环氨基酸。其中含量最高的是甘氨酸，占33.53%，其次是谷氨酸，占20.00%。

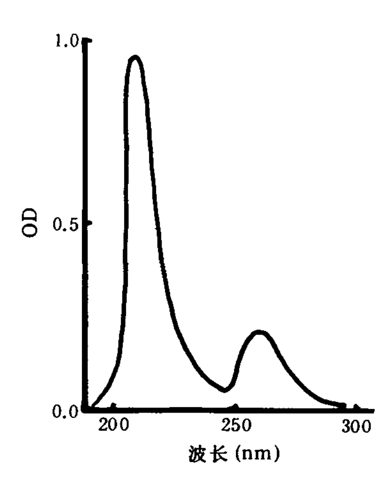


图7 峰5紫外扫描图谱

图8 峰5–2紫外扫描图谱

表1 蜂王浆、峰5、峰5–2对3种指示菌的抑制作用

	浓度(mg/mL)	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	枯草杆菌
王浆干粉	10	滤纸片外1mm	滤纸片外2mm	滤纸片外2mm
峰5	10	无	滤纸片外2mm	滤纸片外2mm
峰5–2	10	无	滤纸片外4mm	滤纸片外4mm

表2 峰5–2样品氨基酸组成

氨基酸	摩尔数(nmol)	摩尔数所占比例(%)	质量(μg)
Asp	14.6474	8.195	1.93521
Thr	8.4699	4.739	1.00894
Ser	15.9391	8.917	1.67504
Glu	24.7312	13.836	3.63870
Gly	81.2419	45.452	6.09883
Ala	17.3537	9.709	1.54604
Leu	7.1664	4.009	0.94002
Lys	8.0513	4.504	1.17702
总计	178.7416		18.19001

3 讨论

(1) 峰5–2是一个分子量很低的小肽，用普通的电泳方法无法鉴定及测定其分子量，既使采用小分子的电泳方法，即提高胶浓度、用银染法染色等，在胶板上也显示不出条带。而用分子量范围为2.8kD的透析袋对峰5水溶液进行透析，其活性成分在透析

外液中，说明其分子量小于 2.8kD。作为一个小肽，用一般的分子排阻法测定峰 5－2 的分子量是不准确的，但根据它在 Sephadex G－15 和 Sephadex G－10 上的洗脱体积可粗略估计其分子量约在 2.0 kD 左右 。根据该小肽各氨基酸成分的摩尔比 Gly: Glu: Asp: Ser: Ala: Thr: Leu: Lys 约为 10：3：2：2：2：1：1：1，并由于其分子量不高，可推测该小肽仅由此 22 个氨基酸组成，由此算得其分子量约为 2.3kD。

(2) 1990 年 Fujiwara 等[7] 报道他们从蜂王浆水溶液中分离出一个活性肽，定名为 Royalisin。峰 5－2 和 Royalisin 都只对革兰氏阳性菌有抑制作用，而对革兰氏阴性菌无作用，但两者有明显的不同。首先它们的分子量差别较大，Royalisin 由 51 个氨基酸组成，分子量为 5 523Da，而峰 5－2 仅为 2.3kD。其次，在氨基酸组成上也有很大区别，Royalisin 含有 6 个半胱氨酸，组成 3 个二硫键，而峰 5－2 不含半胱氨酸。由此可见，两者是蜂王浆中不同的抑菌成分。

关于这些活性肽的确切作用目前还不清楚。它们可能对峰王浆的储存有保护作用，也可能是在被蜜蜂取食后能对抗各种细菌以保护肠道，也许还有其它一些生理功能，这都有待进一步探讨。

(3) 关于昆虫抗菌肽的研究近年已有不少报道。昆虫抗菌肽是昆虫在外源诱导物作用下产生的，是一种非专一性免疫应答反应。昆虫抗菌肽也是一个小肽，分子量多在 10 kD 以内，通常等电点大于 10。昆虫抗菌肽水溶性好，稳定性强，耐高温，耐强酸强碱[8～10]。

峰 5－2 在氨基酸组成和性质上与昆虫抗菌肽有一定相似之处，两者都耐高温，故在分离时都可采用煮沸的方法，使大分子蛋白质变性沉淀而被除去，小分子的肽类物质则保留在上清液中。同时，该小肽富含甘氨酸，这与近年报道的一些昆虫抗菌肽相似。从双翅目伏蝇 *Phormia terraenovae* 体内分离的双翅肽(dipteracin A) 是一个分子量为 9.0kD 的碱性肽，共含 82 个氨基酸残基，其中有 16 个甘氨酸，占 18.3%[11]。从鞘翅目粉岬 *Zephobas atratus* 体内分离的鞘翅肽(coleoptericin A) 分子量为8115 Da，含 74 个氨基酸，其中含甘氨酸 13 个，占 18%，也是一个富含甘氨酸的碱性肽[12]。由此可见甘氨酸在这些抗菌肽中可能起着一些特殊的作用。

但是，本实验从蜂王浆中分离的活性肽和昆虫的抗菌肽在产生方式上却完全不同。昆虫抗菌肽是昆虫在外源诱导物的作用下产生的非专一性的免疫应答产物，物理、化学和生物等刺激都可成为其诱导源[13]，如蓖麻蚕 *Philosamia cynthia ricina* 经 γ 射线照射或注射大肠杆菌皆能诱导产生抗菌肽[14]。而蜂王浆中的活性肽是壮年工蜂的咽下腺分泌的，和其它成分一起存在于蜂王浆中。鲜王浆在低温条件下保存，或制成蜂王浆干粉保存，抗菌物质可在较长时间内 (一到数年) 不失活。从抗菌谱来看，不同昆虫的抗菌肽有所不同，如家蚕 *Bombyx mori* 体内的鳞翅肽(lepidopterin) 具广谱性，对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、苏云金杆菌和绿脓球菌等均有作用[15～17]。 蜜蜂肽 (apidaecin) 作用于革兰氏阴性菌[18]，而伏蝇 *Phormia terraenovae* 的昆虫防御素(insect defensins) 则作用于革兰氏阳性菌[19]。目前从蜂王浆中分离的两种活性肽都仅对革兰氏阳性菌有活性，蜂王浆中是否还存在其它一些活性肽(广谱性的和抗革兰氏阴性菌的)，这有待进一步深入探讨。

参 考 文 献

1 乔廷昆. 蜂王浆. 中国养蜂学会，1985

2 戴静芝，严惠芳，陈幼鸿等. 蜂皇浆和10－羟基－2－癸烯酸的药理活性试验. 医药工业，1985，**16**(5)：219～221

3 Vittek J. Isolation of the musin-binding glycoprotein from royal jelly of bees. Biologia 1970, **25** (9): 593～597

4 Tomoda G, Matsuyama J, Matsuka M. Studies on protein in royal jelly. J. Apic. Res. 1977, **16** (3): 125～130

5 Kromer K J, Childs C N, Spiers R D *et al*. Purification of insulin-like peptides from insect heamolymph and royal jelly. Insect Biochem. 1982, **12** (1): 91～98

6 Takenaka T, Echigo T. Proteins and peptides in royal jelly. Nippon Nogeikagaku Kaishi J. 1983, **7** (12): 1203～1209

7 Fujiwara S, Imai J, Fujiwara M *et al*. A potent antibacterial protein in royal jelly. J. Biol. Chem. 1990, **265** (19): 11333～11337

8 屈贤铭，祁国荣，黄自然. 注射大肠杆菌或超声波诱导蚕体及蓖麻蚕产生抗菌物质的比较研究. 昆虫学报，1984，**27**(3)：268～272

9 屈贤铭，吴克佐. 经聚肌胞核苷酸诱导家蚕蛹血淋巴中六种抗菌肽的分离和鉴定. 生物化学与生物物理学报，1986，**18** (3)：284～292

10 翟启慧. 昆虫分子生物学的一些进展：胚胎发育丝蛋白与可诱导的抗菌蛋白. 昆虫学报，1993，**36** (2)：231～245

11 Dimarcq J L, Keppi E, Dunber B *et al*. Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial protein from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranovae* and complete amino acid sequence of the predominant member diptericin A. Eur. J. Biochem. 1988, **171**: 17～22

12 Bulet P, Cociancich S, Dimarcq J L *et al*. Insect immunity. Isolation from a colepteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. J. Biol. Chem. 1991, **266**: 24520～24525

13 张双全，屈贤铭，戚正武. 不同诱导源对蚕血淋巴及生殖腺中抗菌物质产生的影响. 生物化学杂志，1985，**1** (4)：49～56

14 戴祝英，张双全，吴冬秀. γ－射线及大肠杆菌诱导蓖麻蚕产生抗菌物质的研究. 昆虫学报，1989，**32**(3)：271～277

15 张双全，屈贤铭，戚正武. 昆虫免疫应答及抗菌肽应用前景. 生物化学杂志，1987，**3**(1)：11～18

16 Qu X M, Steiner H, Engstrom A *et al*. Insect immunity. Isolation and structure of cecropins B and D from pupae of the Chinese oak silk moth, *Antheraea pernyi*. Eur. J. Biochem. 1982, **127**: 219～224

17 Hoffmann D, Hultmark D, Boman H G *et al*. Insect immunity. *Galleria mellonella* and other Lepidoptera have cecropinlike factors active against gram-negetive bacteria. Insect Biochem. 1981, **11** (5): 537～548

18 Casteels P, Ampe C, Jacobs F *et al*. Apedaecins: antibacterial peptides from honeybees. EMBO J. 1989, **8**: 2387～2391

19 Lambert J, Keppi E, Dimarcq J L, *et al*. Insect immunity. Isolation from immune blood of dipteran *Phormia*

terranovae of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bacterial peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86: 262 ~ 266

AN ACTIVE PEPTIDE INHIBITING BACTERIA IN THE ROYAL JELLY OF HONEY BEE

Xiao Jingwei Wang Rongjiang Li Shaowen
(*College of Life Sciences, Peking University Beijing* 100871)

Li Juhuai
(*Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences Beijing* 100081)

Abstract A new active peptide which can inhibit the grampositive bacteria strongly, is separated from the soluble components of royal jelly of honey bee (*Apis mellifera ligustica*) with gel filtration. The molecular weight of the peptide is about 2.3kD. This peptide is composed of 8 amino acids, in which glycine accounts for 33 per cent.

Key words royal jelly, active peptide, effect of inhibiting bacteria